

CELL/TISSUE CULTURING DEVICE AND METHOD

Publication number: DE69718812T

Publication date: 2004-01-22

Inventor: SHAALTIEL YOSEPH (IL)

Applicant: METABOGAL LTD (IL)

Classification:

- International: C12M1/00; C12M1/04; C12M1/12; C12M1/26;
C12M3/02; C12M1/00; C12M1/04; C12M1/12;
C12M1/26; C12M3/02; (IPC1-7): C12M1/04; C12M1/12;
C12M1/26; C12M3/02

- European: C12M1/00E; C12M1/04; C12M1/12B; C12M1/26;
C12M3/02

Application number: DE19976018812T 19970926

Priority number(s): IL19960119310 19960926; WO1997IL00316 19970926

Also published as:

WO9813469 (A1)
EP0938544 (A1)
US6391638 (B1)
EP0938544 (A0)
EP0938544 (B1)

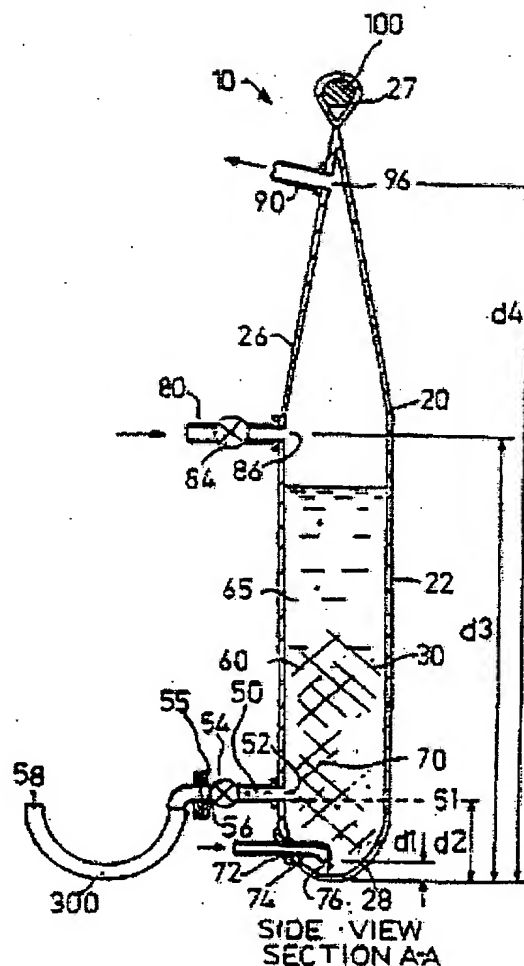
more >>

Report a data error here

Abstract not available for DE69718812T.

Abstract of corresponding document: **WO9813469**

A disposable device and method for axenically culturing and harvesting cells and/or tissue in consecutive cycles. The device consists of a sterilisable transparent and/or translucent disposable container which may be at least partially filled with a suitable sterile biological cell and/or tissue culture medium and/or axenic inoculant and/or sterile air and/or required other sterile additives. The container has means for removing excess air and/or waste gases therefrom, and means for introducing the inoculant and/or culture medium and/or additives therein. The device is characterised by having a reusable harvesting means for enabling harvesting of at least a portion of the medium containing cells and/or tissue when desired, thereby enabling the device to be used continuously for at least one subsequent consecutive culturing/harvesting cycle. The portion of medium containing cells and/or tissue remaining from a previously harvested cycle may serve as inoculant for a next culture and harvest cycle, culture medium and/or additives being provided. The device may thus be used continuously in consecutive cycles, and may be disposed of when it becomes contaminated. In a second aspect of the invention, a battery of these devices, suitably interconnected, enables the scale of production of cells/tissues to be adjusted when required.





(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 18 812 T2 2004.01.22**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 938 544 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 18 812.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/IL97/00316**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 941 180.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/013469**

(86) PCT-Anmeldetag: **26.09.1997**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **02.04.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **01.09.1999**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **29.01.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **22.01.2004**

(51) Int Cl.⁷: **C12M 1/04**

C12M 3/02, C12M 1/26, C12M 1/12

(30) Unionspriorität:

11931096 26.09.1996 IL

(73) Patentinhaber:

Metabogal Ltd., Kiryat Shemona, IL

(74) Vertreter:

**Rechts- und Patentanwälte Lorenz Seidler Gossel,
80538 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

SHAALTIEL, Yoseph, 12255 Beit Hillel, IL

(54) Bezeichnung: **ZELL/GEWEBEKULTURSYSTEM UND -VERFAHREN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung**Gebiet der Erfindung**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Vorrichtungen für das axenische Kultivieren und Ernten von Zellen und/oder Gewebe, einschließlich Bioreaktoren und Fermentoren. Insbesondere betrifft diese Erfindung Vorrichtungen, die entsorgbar sind, die aber dennoch vor Entsorgung derselben kontinuierlich für mehrere aufeinander folgende Kultivier-/Erntezyklen verwendet werden können. Diese Erfindung betrifft ferner Gruppen dieser Vorrichtungen, die für die Produktion von Zellen und Gewebe in großem Umfang verwendet werden können.

Hintergrund

[0002] Zell- und Gewebekultivierverfahren gibt es bereits seit vielen Jahren und diese sind auf dem Gebiet bekannt. Die Möglichkeit des wirtschaftlichen Einsetzens dieser Kultivierverfahren ist auf die Extrahierung von Sekundärmetaboliten, zum Beispiel pharmazeutisch aktive Verbindungen, verschiedene Substanzen zur Verwendung in Kosmetika, Hormone, Enzyme, Proteine, Antigene, Nahrungsmittelzusätze und natürliche Pestizide, aus einer Ernte der kultivierten Zellen oder Gewebe gerichtet. Zwar ist diese Möglichkeit potentiell lukrativ, doch wurde sie dennoch nicht in industriellen Bioreaktoren, welche langsam wachsende pflanzliche und tierische Kulturen verwenden, aufgrund der erforderlichen hohen Investitionskosten effektiv umgesetzt.

[0003] Die vorbekannte Technologie für die Produktion von Zell- und/oder Gewebekultur in industriellem Umfang, die für die Produktion dieser Materialien verwendet werden soll, beruht auf Glasbioreaktoren und Edelstahlbioreaktoren, die teure Investitionsgüter sind. Weiterhin umfassen diese Arten von industriellen Bioreaktoren komplizierte und teure Mischtechnologien, wie zum Beispiel durch teure und komplizierte sterile Dichtungen angetriebene Wirbelmischer; einige teure Fermentoren umfassen eine mehrteilige Druckluftbekonstruktion. Der erfolgreiche Betrieb dieser Bioreaktoren erfordert häufig das Implementieren von Belüftungstechnologien, die ständig verbessert werden müssen. Ferner sind diese Bioreaktoren größtmäßig auf die Spitzenvolumenkapazität abgestimmt, die zu dem Zeitpunkt erforderlich ist. Somit kommt es zu Problemen, wenn von Pilotanlagenfermentoren auf Großfermentoren aufgerüstet wird oder wenn sich die Notwendigkeit ergibt, die Produktion über die Kapazität der vorhandenen Bioreaktoren zu vergrößern. Die Alternative zu einem Bioreaktor mit großer Kapazität, nämlich das Vorsehen einer Reihe kleinerer Glas- oder Edelstahlbioreaktoren, deren Gesamtvolumenkapazität den Anforderungen gerecht wird und welche gleichzeitig ein Maß an Flexibilität bieten, um die Gesamtkapazität zu erhöhen oder senken, ist dennoch viel teurer

als das Vorsehen eines einzigen größeren Bioreaktors. Weiterhin sind die Betriebskosten für die meisten Glas- und Edelstahlbioreaktoren aufgrund der mit der Notwendigkeit des Sterilisierens der Bioreaktoren nach jedem Kultivierzyklus verbundenen niedrigen Erträge ebenfalls hoch. Daher sind die Produkte, die aus Zellen oder Gewebe extrahiert werden, die in solchen Bioreaktoren wachsen, teuer und können zur Zeit auf dem Markt nicht mit vergleichbaren Produkten konkurrieren, die mit alternativen Verfahren produziert werden. Nur eine japanische Firma ist bekannt, die das oben erwähnte Zell-/Gewebekultivierverfahren mit Hilfe von Edelstahlbioreaktoren kommerziell verwendet. Dieses Unternehmen produziert Shikonin, eine Verbindung, die fast ausschließlich nur in Japan verwendet wird.

[0004] Industrie- und auch Großbioreaktor-Vorrichtungen sind herkömmlicherweise permanente oder halbpermanente Komponenten und es ist keine Offenbarung und kein Verschluss für das Konzept einer Einwegbioreaktorvorrichtung für das Lösen der oben erwähnten Probleme bezüglich der Zell-/Gewebekulturproduktion in großem Umfang bekannt. Es sind vielmehr Einwegfermentor- und Einwegbioreaktorvorrichtungen gut bekannt und ausschließlich auf sehr kleine Produktionsvolumina ausgerichtet, zum Beispiel das Brauen zu Hause und für Laborarbeit. Diese Bioreaktorvorrichtungen umfassen im Allgemeinen einen Einwegbeutel, welcher typischerweise aufgeschnitten wird, um die Zell-/Gewebeernte zu ernten, wodurch jede weitere Nutzung des Beutels verhindert wird.

[0005] Ein solcher bekannter Einwegbioreaktor wird von Osmotec, Israel, (Agritech Israel, Ausgabe Nr. 11, Herbst 1997, Seite 19) für den Eineinsatz in kleinem Umfang, zum Beispiel in der Laborforschung, hergestellt. Dieser Bioreaktor umfasst einen konischen Beutel mit einem Einlass, durch welchen Kulturmedium, Luft, Inokulant und weitere mögliche Zusätze eingebracht werden können und hat ein Volumen von nur etwa 1,5 Liter. Die Belüftung erfolgt durch Einleiten sehr kleiner Luftbläschen, was in vielen Fällen zur Schädigung von Zellen führt, insbesondere bei pflanzlichen Zellkulturen. Diese Beutel sind insbesondere eigens für nur einen einzigen Kultur/Erntezyklus ausgelegt und der Beutelinhalt wird durch Abschneiden des Bodens des Beutels entnommen. Diese Beutel sind daher nicht auf eine wirtschaftliche Lösung des Problems ausgelegt, industrielle Mengen der aus der Kultur zu extrahierenden Materialien möglich zu machen, wie dies vorstehend beschrieben wurde.

[0006] Die Entsorgbarkeit dieser Bioreaktorvorrichtungen stellt für den Verwender im Allgemeinen keinen wirtschaftlichen Nachteil dar, da selbst die geringen Investitionskosten dieser Produkte sich mit der einfachen Anwendung, Lagerung und anderen praktischen Überlegungen aufheben. Bei den niedrigen Produktionsmengen, auf die diese Vorrichtungen ausgerichtet sind, ist die Wirtschaftlichkeit dieser Vor-

richtungen von solcher Art, dass keine Motivation vorliegt, die Komplexität der Vorrichtung oder ihres Betriebs zugunsten einer möglichen kontinuierlichen Verwendung der Vorrichtung länger als einen Kultivier-/Erntezyklus zu erhöhen.

[0007] Ferner sind in vielen Fällen sterile Bedingungen außerhalb der Einwegbioreaktorvorrichtungen weder erforderlich noch nötig und sobald diese zum Extrahieren des erntebereiten Ertrags geöffnet wurden, ist es weder kosteneffektiv noch praktisch und häufig auch nicht möglich, die Öffnung steril zu halten, was zu einer Verunreinigung des Beutels und jedweden darin eventuell verbleibenden Inhalts führt. Somit sind diese Einwegvorrichtungen nach einem Kultivierzyklus nicht weiter verwendbar.

[0008] Einwegbioreaktorvorrichtungen sind somit für die Mengen und Produktionsvolumina, die typischerweise von nichtindustriellen Anwendern gefordert werden, relativ günstig und sind von nicht fachlich geschultem Personal relativ einfach zu verwenden. Gerade dieser Aspekt der einfachen Anwendung und niedrigen wirtschaftlichen Kosten im Zusammenhang mit den niedrigen Produktionsvolumina der Einwegvorrichtungen ist ein wesentlicher Pluspunkt der Einwegbioreaktorvorrichtungen. Somit haben die Einwegbioreaktorvorrichtungen des Stands der Technik vom Aufbau, dem Betrieb und der Verringerung der Stückkosten über wachsende Stückzahlen sehr wenig mit industriellen Bioreaktoren gemein und ihre Lehre geht eher weg vom Bereitstellen einer Lösung für die mit industriellen Bioreaktoren verbundenen Probleme, statt eine solche Lösung in irgendeiner Weise zu offenbaren oder vorzuschlagen.

[0009] EP 0,200,792-A beschreibt einen sterilisierbaren Fermentor, welcher einen durch zwei starre Stirnplatten und ein zwischen den Platten straff gespanntes Stück Folienschlauch gebildeten Behälter für das Vorsehen eines inneren Reaktionsraums umfasst. Die aufzumontierenden Teile werden an einer der Stirnplatten befestigt und der Fermentor kann während einer In-Situ-Sterilisation in einen Metallzylinder eingesetzt werden. Der die Endplatten verbindende Folienschlauch kann zwar ein Einwegartikel sein, doch die Stirnplatten sind es nicht.

[0010] US 4,668,632 betrifft einen für das Einleiten von Gas in eine Flüssigkeit geeigneten Sparger, welcher aus einem oder mehreren gasdurchlässigen Elementen besteht, die zwischen einem Gaseinlassmittel und einem Gasabgabemittel angeordnet sind. Die Schrift betrifft ferner ein Verfahren und eine Vorrichtung für das Kultivieren von Zellen, bei dem die Zirkulation der Vorrichtung durch das über diesen Sparger in das Medium eingeleitete Gas verwirklicht wird. Die Hauptkomponenten werden in entfernbarer Weise mittels Schrauben zusammengehalten. Zwar ist weiterhin ein Auslassmittel vorgesehen, doch dient dieses für das flüssige Medium, und das Einlassmittel und das Auslassmittel dieser Schrift lassen lediglich das Medium in den Schlauch und aus die-

sem heraus strömen.

[0011] Die vorliegende Erfindung stellt daher eine bahnbrechende Lösung der oben erwähnten Probleme dar, wobei sie eine Einwegbioreaktorvorrichtung für die Großproduktion von Zell-/Gewebe-kulturen zur Hand gibt. Die erfindungsgemäße Vorrichtung ist zwar eine Entwegvorrichtung, doch ist sie dadurch gekennzeichnet, dass sie einen wieder verwendbaren Ernteausschuss umfasst, um bei Wunsch das Ernten mindestens eines Teils des die Zellen und/oder das Gewebe enthaltenden Mediums zu ermöglichen, wodurch die Vorrichtung kontinuierlich für eine oder mehrere folgende konsekutive Kultivier-/Erntezyklen verwendet werden kann. In einem industriellen Umfeld kann die Sterilität des Ernteausschlusses während und nach dem Ernten bei relativ geringen Kosten mit einem signifikant hohen Grad durch Vorsehen von zum Beispiel einer sterilen Abdeckung, in welcher alle nötigen Verbindungen Unterbrechungen von Versorgungen zu und von der Vorrichtung vorgenommen werden können, gewährleistet werden. Wenn die Vorrichtung schließlich verunreinigt wird, kann sie entsorgt werden. Diese Vorrichtungen können billig hergestellt werden, selbst bei Produktionsvolumina von 50 Liter oder mehr pro Kultur. Weiterhin ist die Möglichkeit der Durchführung einer Reihe von Kultivier-/Erntezyklen wirtschaftlich lukrativ, was die effektiven Kosten pro Vorrichtung noch weiter senkt. Eine Gruppe dieser Vorrichtungen kann wirtschaftlich angeordnet werden und die Anzahl der Vorrichtungen in der Gruppe kann so festgelegt werden, dass die Produktion eng an die Nachfrage ausgerichtet wird. Somit kann der Übergang von Pilotanlagenbioreaktoren zur Massenproduktion ebenfalls in einer relativ einfachen und wirtschaftlichen Weise durch Hinzufügen von weiteren Vorrichtungen zur Gruppe verwirklicht werden. Weiterhin führt das relativ niedrige Produktionsvolumen jeder Vorrichtung verbunden mit dem Fehlen von Feststoffmischgeräten verglichen mit typischen Edelstahlbioreaktoren zu relativ höheren Erträgen.

[0012] Ein Ziel der vorliegenden Erfindung besteht darin, eine Vorrichtung und ein zugehöriges Verfahren für das axenische Kultivieren und Ernten von Zellen und/oder Gewebe, welches nicht die vorgenannten Nachteile aufweist, zur Hand zu geben.

[0013] Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung besteht darin, eine Vorrichtung zur Hand zu geben, welche wirtschaftlich in der Herstellung und einfach in der Verwendung ist.

[0014] Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung besteht darin, eine Vorrichtung zur Hand zu geben, welche eine entsorgbar ist, die aber dennoch kontinuierlich über mehrere konsekutive Zyklen der Kultivierung und des Erntens der gewünschten Zellen und/oder Gewebe verwendet werden kann.

[0015] Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung besteht darin, eine Vorrichtung zur Hand zu geben, bei der das Inokulant nur für den ersten Kultivierzyklus vorgesehen werden muss, während Inokulant für

folgende Zyklen durch einen Teil der Kulturlösung, welche nach dem Ernten derselben in einem vorherigen Zyklus in der Vorrichtung verbleibt, vorgesehen wird.

[0016] Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung besteht darin, eine Gruppe dieser Vorrichtungen für die industrielle Produktion von Zellen und/oder Geweben zur Hand zu geben.

Zusammenfassende Beschreibung der Erfindung

[0017] Es wird eine Einwegvorrichtung und ein entsprechendes Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bzw. 34 zur Hand gegeben. Die Vorrichtung kann nach Verunreinigung entsorgt werden. In einer zweiten Ausgestaltung der Erfindung ermöglicht eine Gruppe dieser Vorrichtungen, die geeignet mit einander verbunden sind, die bedarfsgemäße Anpassung des Produktionsumfangs der Zellen/Gewebe.

Beschreibung der Figuren

[0018] Die **Fig. 1a** und **1b** zeigen jeweils die Hauptkomponenten einer bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführung in Vorderansicht und in seitlicher Querschnittansicht.

[0019] Die **Fig. 2a** und **2b** zeigen jeweils die Hauptkomponenten einer zweiten erfindungsgemäßen Ausführung in Vorderansicht und in seitlicher Querschnittansicht.

[0020] **Fig. 3** zeigt die Hauptkomponenten einer dritten erfindungsgemäßen Ausführung in seitlicher Querschnittansicht.

[0021] **Fig. 4** zeigt die Falzlinien der bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführung in Vorderansicht.

[0022] **Fig. 5** zeigt die Hauptkomponenten einer bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführung der Gruppe.

Beschreibung

[0023] Die vorliegende Erfindung betrifft eine Einwegvorrichtung für das axenische Kultivieren und Ernten von Zellen und/oder Gewebe in mindestens einem Zyklus, wobei die Vorrichtung einen sterilisierbaren transparenten und/oder lichtdurchlässigen nicht starren Einwegbehälter mit einem oberen Ende und einem unteren Ende umfasst, welcher zumindest teilweise mit einem geeigneten sterilen biologischen Zell- und/oder Gewebekulturmedium und/oder axenischen Inokulant und/oder steriler Luft und/oder erforderlichen anderen sterilen Zusätzen gefüllt werden kann, wobei der Behälter Folgendes umfasst:

- (i) Gasauslassmittel für das Ablassen überschüssiger Luft und/oder Abgase aus dem Behälter;
 - (ii) Zusatzeinlassmittel für das Einbringen des Inokulants und/oder des Kulturmediums und/oder der Zusätze in den Behälter;
- und dadurch gekennzeichnet, dass er weiterhin umfasst:

(iii) wiederverwendbare Erntemittel, welche geeignete Stromsteuermittel für das Ermöglichen des Erntens mindestens eines gewünschten Teils des die Zellen und/oder das Gewebe enthaltenden Mediums, wenn dies gewünscht ist, umfassen, wodurch die Vorrichtung ständig für mindestens einen weiteren folgenden Kultivier/Erntezyklus verwendet werden kann,

wobei der Behälter so ausgelegt ist, dass ein Rest des die Zellen und/oder das Gewebe enthaltenden Mediums in dem Behälter verbleiben und als Inokulant für einen nächsten Kultur- und Erntezyklus dienen kann.

[0024] Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin eine Vorrichtung, welche weiterhin Lufteinlassmittel für das Einbringen steriler Luft in Form von Bläschen in das Kulturmedium durch eine erste Einlassöffnung umfasst, wobei das Lufteinlassmittel mit einer geeigneten Luftzufuhr verbindbar ist.

[0025] Somit umfasst die allgemein mit (10) bezeichnete Vorrichtung unter Bezug auf die **Fig. 1, 2** und **3**, welche jeweils einer bevorzugten, einer zweiten und einer dritten Ausführung der Vorrichtung entsprechen, einen transparenten und/oder lichtdurchlässigen Behälter (20) mit einem oberen Ende (26) und einem unteren Ende (28). Der Behälter (20) umfasst eine Seitenwand (22), welche vorzugsweise im Wesentlichen zylindrisch ist, wenngleich andere Formen wie rechteckig oder polyedrisch zum Beispiel auch geeignet sein können. Vorzugsweise ist das untere Ende (28) geeignet geformt, um die Sedimentation dort zu minimieren. In einer bevorzugten Ausführung ist zum Beispiel das untere Ende (28) im Wesentlichen stumpfkegelig oder umfasst zumindest nach oben geneigte Wände. In der zweiten Ausführung umfasst das untere Ende (28) eine nach oben geneigte Wand (29). In der dritten Ausführung ist das untere Ende (28) im Wesentlichen zylindrisch oder alternativ konvex. Die oben erwähnten Konfigurationen des unteren Endes (28) in Verbindung mit der Position des Auslasses (76) (der nachstehend beschrieben wird) nah des unteren Endes (28) ermöglicht es, dass über den Auslass (76) zugeführte Luft eine Mischbewegung des Behälterinhalts am unteren Ende (28) auslöst, was dort die Sedimentation effektiv minimiert. Dennoch kann das untere Ende in anderen erfindungsgemäßen Ausführungen im Wesentlichen flach sein. Der Behälter (20) umfasst ein füllbares Innenvolumen (30), welches typischerweise zwischen 5 und 50 Liter liegt, wenngleich die Vorrichtung (10) alternativ ein Innenvolumen aufweisen kann, das über 50 Liter oder unter 5 Liter liegt. Das Innenvolumen (30) kann mit einem geeigneten sterilen biologischen Zell- und/oder Gewebekulturmedium (65) und/oder axenischen Inokulant (60) und/oder steriler Luft und/oder erforderlichen anderen sterilen Zusätzen, wie zum Beispiel Antibiotika oder Fungiziden, gefüllt werden, was nachstehend beschrieben wird. In den oben erwähnten Ausführungen ist der

Behälter (20) im Wesentlichen nicht starr, wobei er vorzugsweise aus einem nicht starren Kunststoffmaterial gewählt aus der Gruppe, welche Polyethylen, Polycarbonat, ein Copolymer von Polyethylen und Nylon, PVC und EVA umfasst, hergestellt wird. Optional kann der Behälter (20) aus einem Laminat von mehr als einer Schicht dieser Materialien gefertigt sein.

[0026] Wie für die dritte Ausführung in Fig. 3 gezeigt, kann der Behälter (20) optional zwei konzentrische Außenwände (24) umfassen, um die mechanische Festigkeit zu verbessern und das Risiko der Verunreinigung des Inhalts über die Behälterwände zu minimieren.

[0027] In der bevorzugten, in der zweiten und in der dritten Ausführung dient die Vorrichtung (10) für aerobischen Einsatz. Somit umfasst der Behälter (20) weiterhin ein Lufteinlassmittel für das Einleiten steriler Luft in Form von Bläschen (70) in das Kulturmedium (65) durch eine Lufteinlassöffnung (72). In den oben erwähnten Ausführungen umfasst das Lufteinlassmittel ein Rohr (74), das mit einer (nicht abgebildeten) geeigneten Luftzufuhr verbindbar ist und sich von der Einlassöffnung (72) zu einer Position in dem Behälter (20) bei einem Abstand d1 vom Boden des unteren Endes (28) erstreckt, wobei d1 typischerweise rund 1 cm betragen kann, wenngleich er größer oder kleiner als 1 cm sein kann. Das Rohr (74) kann aus Silizium oder einem anderen geeigneten Kunststoffmaterial sein und ist vorzugsweise biegsam. Das Rohr (74) umfasst somit einen Luftauslass (76) eines geeigneten Durchmessers, um Luftbläschen (70) eines erforderlichen mittleren Durchmessers zu erzeugen. Diese Bläschen belüften nicht nur das Medium (65), sondern dienen auch zum Mischen des Inhalts des Behälters, wodurch die Sedimentation am unteren Ende (28) ebenfalls minimiert wird, wie vorstehend beschrieben wurde. Die Größe der durch das Lufteinlassmittel zugeführten Bläschen schwankt abhängig von der Verwendung der Vorrichtung von gut unter 1 mm bis zu über 10 mm Durchmesser. In manchen Fällen, insbesondere bei pflanzlichen Zellen, können kleine Bläschen sogar die Zellwände beschädigen, und ein mittlerer Bläschendurchmesser von nicht weniger als 4 mm überwindet im Wesentlichen dieses mögliche Problem. In anderen Fällen sind viel kleinere Bläschen vorteilhaft und es kann ein Sparger am Luftauslass (76) verwendet werden, um die Größe der Bläschen zu reduzieren. Optional kann der Auslass (76) von der Position her am unteren Ende (28) mittels einer (nicht abgebildeten) Halterung oder eines anderen auf dem Gebiet bekannten Mittels eingeschränkt werden.

[0028] In anderen Ausführungen dient die Vorrichtung (10) für anaerobische Zwecke und umfasst somit nicht das Lufteinlassmittel.

[0029] Der Behälter (20) umfasst weiterhin Gasauslassmittel für das Ablassen überschüssiger Luft und/oder Abgase aus dem Behälter (20). Diese Gase sammeln sich an dem oberen Ende (26) des Behäl-

ters (20). Das Gasauslassmittel kann ein Rohr (90) mit einem Einlass (96) an oder nahe dem oberen Ende (26) bei einem Abstand d4 von dem Boden des unteren Endes (28) umfassen, wobei d4 bei der bevorzugten Ausführung typischerweise 90 cm beträgt. Das Rohr (90) kann aus Silizium oder einem anderen geeigneten Kunststoffmaterial bestehen und ist vorzugsweise biegsam. Das Rohr (90) ist mit einem (nicht abgebildeten) geeigneten Abluftmittel durch bekannte Mittel verbindbar. Das Abluftmittel umfasst weiterhin Mittel, wie zum Beispiel ein geeignetes Einwegventil oder Filter für das wesentliche Verhindern eines Einbringens von Verunreinigungen über das Gasauslassmittel in den Behälter. Zumindest ein Teil des oberen Endes (26) kann geeignet konfiguriert sein, um das Sammeln von Abgasen vor deren Entfernen über den Einlass (96) zu erleichtern. Somit verengt sich in der bevorzugten und in der zweiten Ausführung der obere Teil des oberen Endes (26) zunehmend zu einer minimalen Querschnittfläche nahe der Position des Einlasses (96). Alternativ kann zumindest der obere Teil des oberen Endes (26) entsprechend im Wesentlichen stumpfkegelig oder konvex sein.

[0030] Der Behälter (20) umfasst weiterhin Zusatzeinlassmittel für das Einbringen von Inokulant und/oder Kulturmedium und/oder Zusätzen in den Behälter. In den oben erwähnten Ausführungen umfasst das Zusatzeinlassmittel ein geeignetes Rohr (80) mit einem Auslass (86) vorzugsweise an oder nahe dem oberen Ende (26) bei einem Abstand d3 von dem Boden des unteren Endes (28), wobei d3 bei der bevorzugten Ausführung typischerweise etwa 68 cm beträgt. Das Rohr (80) kann aus Silizium oder einem anderen geeigneten Kunststoffmaterial bestehen und ist vorzugsweise biegsam. Das Rohr (80) ist durch bekannte Mittel mit einer geeigneten sterilisierten Zufuhr für Inokulant und/oder Kulturmedium und/oder Zusätzen verbindbar. Das Zusatzeinlassmittel umfasst weiterhin Mittel für das wesentliche Verhindern des Einbringens von Verunreinigungen über das Zusatzeinlassmittel in den Behälter und umfasst in diesen Ausführungen ein geeignetes Einwegventil bzw. Filter (84). Typischerweise bleibt der Füllstand des Inhalts des Behälters (20) unter der Höhe des Auslasses (86).

[0031] Der Behälter (20) umfasst weiterhin ein wiederverwendbares Erntemittel für das Ernten mindestens eines gewünschten ersten Teils des die Zellen und/oder das Gewebe enthaltenden Mediums, wenn dies gewünscht ist, wodurch die Vorrichtung kontinuierlich für mindestens einen folgenden Erntezyklus verwendet werden kann. Ein verbleibender zweiter Teil des die Zellen und/oder das Gewebe enthaltenden Mediums dient als Inokulant für einen nächsten Kultur- und Erntezyklus, wobei das Kulturmedium und/oder die erforderlichen Zusätze vorgesehen werden. Das Erntemittel kann auch zum Einbringen des ursprünglichen Volumens an Inokulant in den Behälter sowie für ein Ermöglichen des Strömens des ge-

ernteten Materials hierdurch und aus dem Behälter heraus verwendet werden. In den oben erwähnten Ausführungen umfasst das Erntemittel ein Rohr (50) mit einem Einlass (52) in Verbindung mit dem Innenvolumen (30) sowie einen Auslass (56) außerhalb des Behälters (20). Das Rohr (50) kann aus Silizium oder einem anderen geeigneten Kunststoffmaterial bestehen und ist vorzugsweise biegsam. Das Rohr (50) hat einen relativ großen Durchmesser, typischerweise etwa 2 cm, da die geernteten Zellen und/oder Gewebe, die hier durchströmen, Klumpen aus Zellpartikeln enthalten können, die schmalere Rohre verstopfen können. Vorzugsweise befindet sich der Einlass (52) nahe des unteren Endes (28) des Behälters (20), so dass nur der Behälterinhalt über dem Einlass (52) geerntet wird. Somit verbleibt am Ende jedes Erntezyklus der zweite Teil des die Zellen und/oder Gewebe enthaltenden Mediums automatisch am unteren Ende (28) des Behälters (20) bis zu einem Füllstand unterhalb der Höhe (51) des Einlasses (52), der sich bei einem Abstand d2 vom Boden des unteren Endes (28) befindet. Typischerweise beträgt d2 bei der bevorzugten Ausführung etwa 25 cm. Alternativ kann sich der Einlass (52) am niedrigsten Punkt im Behälter (20) befinden, wobei der Bediener manuell sicherstellen würde, dass ein geeigneter Teil eines die Zellen und/oder Gewebe enthaltenden Mediums nach dem Ernten eines gewünschten Teils des Mediums und der Zellen und/oder Gewebe in dem Behälter (20) verbleiben würde. Das Erntemittel umfasst weiterhin Strömungsmittel, wie zum Beispiel ein geeignetes Ventil (54) und/oder ein aseptisches Verbindungsstück (55) zum Absperren und Zulassen des Materialstroms in oder aus dem Behälter (20) über das Erntemittel. Typischerweise besteht das aseptische Verbindungsstück (55) aus Edelstahl und auf dem Gebiet sind viele Beispiele hierfür vorbekannt. Vorzugsweise umfasst das Erntemittel weiterhin Verunreinigungsverhinderungsmittel für das wesentliche Verhindern des Einbringens von Verunreinigungen nach dem Ernten über das Erntemittel, in den Behälter. In der bevorzugten, in der zweiten und in der dritten Ausführung umfasst das Verunreinigungsverhinderungsmittel eine Fluidfalle (300). Die Fluidfalle (300) hat vorzugsweise die Form eines im Wesentlichen U-förmigen Hohlrohrs, dessen einer Arm an dem Auslass (56) des Erntemittels angebracht ist und dessen anderer Arm eine äußere Öffnung (58) aufweist. Geerntete Zellen/Gewebe können über das Erntemittel, die Fluidfalle (300) und die Öffnung (58) aus der Vorrichtung (10) strömen, um anschließend in einem nachstehend beschriebenen geeigneten Aufnahmetank aufgefangen zu werden. Nach Beendigung des Erntens könnte ggf. Luft zusammen mit einem gewissen Rückstromen geernteten Materials über die Öffnung (56) in das Erntemittel eingebracht werden, wodurch möglicherweise Verunreinigungen in die Vorrichtung eingebracht werden könnten. Das U-Rohr (300) überwindet dieses mögliche Problem im Wesentlichen durch Auffangen eines Teils des ge-

ernteten Materials, d. h. Zellen/Gewebe, stromabwärts der Öffnung (56), wodurch verhindert wird, dass Luft und mögliche Verunreinigungen in das Erntemittel gelangen. Sobald das Erntemittel über das Ventil (54) abgesperrt ist, wird das U-Rohr (300) entfernt und für die nächste Verwendung typischerweise sterilisiert oder weggeworfen. Das U-Rohr (300) kann aus Edelstahl oder einem anderen geeigneten starren Kunststoffmaterial bestehen.

[0032] In den oben erwähnten Ausführungen umfasst der verbleibende zweite Teil des die Zellen und/oder Gewebe enthaltenden Mediums typischerweise zwischen 10% und 20% des ursprünglichen Volumens des Kulturmediums und Inokulants, wenn gleich der zweite Teil bei Bedarf 20% übersteigen und bei bis zu 45% oder mehr oder bei unter 10% bis hinunter bei 2,5% oder weniger des ursprünglichen Volumens liegen kann.

[0033] Die Vorrichtung (10) umfasst optional weiterhin Befestigungsmittel zum Befestigen derselben an einem überhängenden Halterungsaufbau. In den oben erwähnten Ausführungen kann der Halterungsaufbau eine Stange (100) (Fig. 1, 2) oder (nicht abgebildete) Ringe umfassen. In der dritten Ausführung kann das Befestigungsmittel einen vorzugsweise integral an dem oberen Ende (26) des Behälters (20) angebrachten Haken (25) umfassen. Alternativ und wie für die bevorzugte und die zweite Ausführung in den Fig. 1 und 2 jeweils gezeigt, kann das Befestigungsmittel eine vorzugsweise biegsame und im Wesentlichen zylindrische Schlaufe (27) aus geeignetem Material, typischerweise das gleiche Material wie für den Behälter (20) verwendet wurde, entweder integral mit oder geeignet an dem oberen Ende (26) der Vorrichtung (mittels Schmelzschweißen zum Beispiel) angebracht umfassen.

[0034] Der Behälter (20) kann durch Schmelzverbinden von zwei geeigneten Platten geeigneten Materials entlang von vorbestimmten Nähten gebildet werden, wie vorstehend durch Beispiele gezeigt. Unter Bezug auf Fig. 4 können zwei Platten (200) eines Materials in einer in etwa länglichen, rechteckigen Form geschnitten und übereinander gelagert werden. Die Platten werden dann in einer auf dem Gebiet vorbekannten Weise mit einander schmelzverbunden, um Nähte entlang der Peripherien (205) und (206) der beiden längeren Seiten und entlang der Peripherie eines der kürzeren Enden (210) zu bilden, und wieder parallel und dazu nach innen versetzt, um eine Naht (220) an dem oberen Ende des Behälters (20) auszubilden. Die Schmelzschweißnähte (207) und (208) entlang den langen Seiten, die zwischen diesen parallelen kurzen Endnähten (210) und (220) angeordnet sind, können abgeschnitten oder anderweitig entfernt werden, um eine Materialschlaufe (27) effektiv zu bilden. Das untere Ende (28) des Behälters (20) wird durch Schmelzverbinden des verbleibenden kurzen Endes der Platten entlang der beiden schrägen Nahtlinien (230) und (240) gebildet, welche von den Nähten (205) und (206) der langen Seiten

zueinander konvergieren. Wahlweise können die beiden schrägen Nahtlinien (230) und (240) über dem Scheitel durch eine andere schmelzgeschweißte Nahtlinie (260) in etwa orthogonal zu den langen Seitennähten (205) und (206) verbunden werden. Vor dem Schmelzverschweißen der beiden Platten können starre Kunststoffvorsprünge (270), (290), (280) und (250) an Stellen schmelzgeschweißt werden, die dem Lufteinlassmittel, dem Gasauslassmittel, dem Zusatzeinlassmittel und dem Erntemittel jeweils entsprechen. Diese Vorsprünge stellen geeignete mechanische Befestigungspunkte für jedes der entsprechenden Einlass- und Auslassmittel dar.

[0035] In allen Ausführungen ist die Vorrichtung (10) aus einem Material bzw. Materialien gefertigt, die biologisch kompatibel sind und welche das Sterilisieren des Behälters vor der ersten Anwendung erlauben.

[0036] Die vorliegende Erfindung betrifft auch eine Gruppe von Einwegvorrichtungen für das axenische Kultivieren und Ernten von Zellen und/oder Gewebe in Zyklen, wobei jede von mehreren dieser Vorrichtungen der vorstehend genannten und beschriebenen Vorrichtung (10) vom Aufbau und Betrieb ähnelt.

[0037] Unter Bezug auf Fig. 5 umfasst eine Gruppe (500) mehrere der Vorrichtungen (10), welche an einem oder mehreren (nicht abgebildeten) Rahmen mittels Befestigungsmittel gehalten sind. Typischerweise kann die Gruppe in eine Reihe von Gruppierungen aufgeteilt werden, wobei jede Gruppierung eine Reihe von Vorrichtungen (10) umfasst.

[0038] In der bevorzugten Ausführung sind die Lufteinlassmittel der Vorrichtungen (10) in jeder Gruppierung mit einander verbunden. Somit sind die Lufteinlassrohre (74) jeder Vorrichtung (10) der Gruppierung mit dem gemeinsamen Rohrsystem (174) verbunden, welches ein freies Ende (170) aufweist, das mit einem aseptischen Verbindungsstück (175) versehen ist. Durch einen geeigneten Luftkompressor (100) mit einem geeigneten Sterilisierungsmittel (110), zum Beispiel einem oder mehreren Filtern, wird sterilisierte Luft bereitgestellt. Der Kompressor (100) umfasst ein Zufuhrrohr (101) mit einem aseptischen Verbindungsstück (176) an seinem freien Ende, welches typischerweise mit dem aseptischen Verbindungsstück (175) verbindbar ist, welches an dem freien Ende des gemeinsamen Rohrsystems (174) angeordnet ist. Diese Verbindung erfolgt zu Beginn jedes Ablaufs von Wachstum/Erntezyklen in einer beweglichen sterilen Abdeckung (380), um sicherzustellen, dass während der Verbindung sterile Bedingungen gewahrt werden. Die sterile Abdeckung (380) stellt ein einfaches, relativ billiges System für das Verbinden mit der jeweiligen Versorgung, wie z. B. Luft, Medien, Inokulant und geerntete Zellen, von und zu der Gruppierung von Vorrichtungen (10) unter im Wesentlichen sterilen Bedingungen dar. Analog werden am Ende jedes Ablaufs der Wachstums/Erntezyklen die Verbindungsstücke (175) und (176) in der sterilen Abdeckung (380) abgetrennt und die verwendeten Vorrichtungen weggeworfen, wodurch das Verbindungs-

stück (175) am Kompressorende mit dem Verbindungsstück (176) einer neuen Gruppierung von Vorrichtungen verbunden werden kann. Sterilisierte Luft wird typischerweise ständig oder alternativ in vorbestimmten Abständen während jedes Kultivierzyklus zugeführt.

[0039] In der bevorzugten Ausführung wird überschüssige Luft und/oder Abgase von jeder der Vorrichtungen (10) über ein gemeinsames Rohrsystem (290), welches geeignet mit jedem entsprechenden Gasauslassmittel (90) verbunden ist, an die Atmosphäre abgelassen. Das gemeinsame Rohrsystem (290) ist mit geeigneten Mitteln (210), z. B. mit einem oder mehreren Filtern, für das Verhindern eines Strömens von Verunreinigungen in die Vorrichtungen (10) versehen. Alternativ kann das Gasauslassmittel (90) jeder Vorrichtung (10) eventuell einzeln an die Atmosphäre ablassen, vorzugsweise über geeignete Filter, welche im Wesentlichen ein Strömen von Verunreinigungen in die Vorrichtung (10) verhindern.

[0040] Medien und Zusätze sind in einem oder mehreren Aufbewahrungstanks (340) enthalten. Mikroelemente, Makroelemente und Vitamine können zum Beispiel in unterschiedlichen Tanks aufbewahrt werden, während Zusätze wie Antibiotika und Fungizide auch in anderen separaten Tanks aufbewahrt werden können. Pumpmittel (345), die jedem Tank zur Verfügung stehen, ermöglichen das Liefern der gewünschten relativen Anteile jedes Bestandteils der Medien und/oder Zusätze bei einer vorbestimmten und steuerbaren Strömgeschwindigkeit zu einem statischen Mixer (350), durch welchen Wasser – entweder destilliert oder geeignet gefiltert und gereinigt – von einer geeigneten Zufuhr (360) vorzugsweise mit Hilfe eines geeigneten Pumpmittels (345) (Fig. 5) fließt. Durch Anpassen der Strömraten der Pumpmittel (345) und (346) zum Beispiel kann die Konzentration der Medien sowie der Zusätze, die zur Zufuhr in die Vorrichtungen (10) zur Verfügung stehen; gesteuert werden. Medien und/oder Zusätze, die mit Wasser gemischt sind, können dann von dem statischen Mischer (350) unter sterilen Bedingungen über einen Filter (310) und ein Zufuhrrohr (370) mit einem aseptischen Verbindungsstück (375) an seinem freien Ende (390) zugeführt werden.

[0041] In der bevorzugten Ausführung ist der Einlass des Zusatzrohrs (80) jeder entsprechenden Vorrichtung (10) in der Gruppierung von Vorrichtungen über das gemeinsame Rohrsystem (180) verbunden, welches an seinem freien Ende ein gemeinsames aseptisches Verbindungsstück (376) umfasst. Das gemeinsame aseptische Verbindungsstück (376) kann dann in der sterilen Abdeckung (380) mit dem aseptischen Verbindungsstück (375) am freien Ende (390) des Medien- und Zusatzrohrs (370) verbunden werden, wodurch jede Vorrichtung (10) der Gruppe bzw. der Gruppierung mit Medien und Zusätzen versorgt werden kann. Am Ende der Lebensdauer der Vorrichtungen (10) und vor Entsorgen derselben werden die aseptischen Verbindungsstücke (375) und

(376) in der sterilen Abdeckung abgetrennt. Das aseptische Verbindungsstück (375) ist dann bereit zur Verbindung mit dem neuen aseptischen Verbindungsstück (376) der nächsten sterilisierten Gruppierung von neuen Vorrichtungen (10) der Gruppe, bereit für den nächsten Ablauf von Kultivier-/Erntezyklen.

[0042] Die sterile Abdeckung (380) kann auch wieder für das Verbinden des Medien/Zusatz tanks (350) mit jeder einzelnen einer Reihe von Gruppierungen von Vorrichtungen (10) in der Gruppe während der Lebensdauer der Vorrichtungen in diesen Gruppierungen eingesetzt werden. Wenn eine Gruppierung von Vorrichtungen mit Medien/Zusätzen versorgt wurde, wird somit das aseptische Verbindungsstück (376) dieser Gruppierung vorübergehend in der sterilen Abdeckung (380) aseptisch abgedichtet, welche dann zur nächsten Gruppierung von Vorrichtungen bewegt wird, wo deren gemeinsames aseptisches Verbindungsstück (376) mit dem sterilen Verbindungsstück (375) des Rohrs (370) verbunden wird, wodurch diese Gruppierung von Vorrichtungen mit Medien/Zusätzen versorgt werden kann.

[0043] In einer anderen Ausführung kann die bewegliche sterile Abdeckung (380) zum Verbinden des freien Endes (390) eines mit dem statischen Misch tank (350) verbundenen, bevorzugt biegsamen Zufuhrrohrs abwechselnd mit dem Zusatzeinlassmittel jeder Vorrichtung (10) verwendet werden. Die sterile Abdeckung (380) kann dann von einer Vorrichtung (10) zur nächsten bewegt werden, wobei jedes Mal das Ende (390) mit dem Einlassende des entsprechenden Rohrs (80) verbunden wird, damit jeder Vorrichtung abwechselnd Medien zugeführt werden können. Die sterile Abdeckung (380) zusammen mit dem aseptischen Verbindungsmittel, vorzugsweise aus Edelstahl, an dem Ende (390) und dem Einlass des Rohrs (80) der entsprechenden Vorrichtung (10) ermöglichen jeweils das einfache Verbinden und spätere Abtrennen jeder Vorrichtung (10) am Ende (390) und somit die Medienzufuhr unter sterilen Bedingungen. Auf dem Gebiet sind viele andere Beispiele geeigneter Verbindungsmittel für das Verbinden von zwei Rohren bekannt. Geeignete Filter werden am Ende (390) und am Rohr (80) jeweils vorgesehen, um eine mögliche Verunreinigung des Behälterinhalts zu verhindern oder zumindest zu minimieren. Die sterile Abdeckung (380) kann so automatisch oder manuell von Vorrichtung (10) zu Vorrichtung (10) bewegt werden und an jeder Vorrichtung kann ein Bediener wiederum die Vorrichtung (10) mit Hilfe der sterilen Abdeckung (380) mit der Medienzufuhr verbinden, die Vorrichtung mit einer geeigneten Menge von Medien und/oder Zusätzen füllen und dann die sterile Abdeckung (380) von der Vorrichtung abtrennen, um dann mit der nächsten Vorrichtung weiterzumachen. Das Ende (390) kann natürlich so ausgelegt sein, dass es mehrere Verbindungsmittel (375) statt nur ein einziges sterilisiertes Verbindungsmittel (375) umfasst, so dass an Stelle von einem eine ähnliche Vielzahl von

Vorrichtungen (10) mittels des Wagens (380) mit entsprechenden Verbindungsmitteln (376) nacheinander mit der Medienzufuhr verbunden werden können.

[0044] Jedes Mal werden vor Verbinden des Endes (390) mit jeder Vorrichtung bzw. jedem Satz oder jeder Gruppierung von Vorrichtungen die entsprechenden Verbindungsmittel (375) und (376) typischerweise drucksterilisiert.

[0045] In einer noch anderen Ausführung der Gruppe verbinden ein einzelnes Rohr oder ein Satz (nicht abgebildeter) Rohre jeweils nacheinander den statischen Mixer (350) mit einer Vorrichtung (10) oder einem entsprechenden Satz Vorrichtungen (10), wobei eine Förderanlage die Vorrichtung (10) bzw. den Satz Vorrichtungen (10) zu dem einzelnen Rohr oder Satz Rohre oder umgekehrt jeweils transportiert. Nach Befüllen der Vorrichtung (10) oder des Satzes Vorrichtungen (10) ermöglicht die Förderanlage das Verbinden einer weiteren Vorrichtung (10) oder eines weiteren Satzes von Vorrichtungen (10) mit dem statischen Mixer (350) mittels des einzelnen Rohrs bzw. dem Satz Rohre.

[0046] In der bevorzugten Ausführung sind die Erntemittel jeder der Vorrichtungen (10) der Gruppierung miteinander verbunden. Somit sind die Ernterohre (50) jeder Vorrichtung (10) mit einem gemeinsamen Ernterohrsystem (154), welches ein freies Ende aufweist, das mit einem aseptischen Verbindungsstück (155) versehen ist, verbunden. Vorzugsweise kann jedes der Ernterohre (50) wie vorstehend beschrieben ein Ventil (54) umfassen, um den Strom geernteter Zellen von jeder entsprechender Vorrichtung (10) abzusperren oder zu gestatten. Wenn somit zum Beispiel festgestellt wird, dass eine Reihe von Vorrichtungen in einer bestimmten Gruppierung verunreinigt sind, andere Vorrichtungen dagegen nicht, dann können die Zellen in diesen letzteren Vorrichtungen geerntet werden, ohne dass eine Verunreinigung durch die vorherigen Vorrichtungen befürchtet werden muss, solange die Ventile (54) der verunreinigten Vorrichtungen geschlossen bleiben. Vorzugsweise umfasst das gemeinsame Rohrsystem weiterhin ein gemeinsames Absperrventil (259) stromaufwärts des aseptischen Verbindungsstücks (155). Vorzugsweise wird das Verunreinigungsverhinderungsmittel für das wesentliche Verhindern eines Einbringens von Verunreinigungen in den Behälter über das Erntemittel nach dem Ernten vorgesehen. In der bevorzugten Ausführung umfasst das Verunreinigungsverhinderungsmittel eine im Wesentlichen U-förmige Fluidfalle (400) mit einem aseptischen Verbindungsstück (156) an einem Arm derselben, wobei der andere Arm eine Öffnung (158) in Fluidverbindung mit einem Aufnahmetank (590) aufweist. Die aseptischen Verbindungsstücke (155) und (156) werden dann in der beweglichen sterilen Abdeckung (380) unter sterilen Bedingungen mit einander verbunden. Das Ernten wird dann durch Öffnen der Ventile (54) aller Vorrichtungen in der Gruppierung, die nicht verunreinigt sind, sowie des gemeinsamen Ventils (259) durchge-

führt. Zellen von der Gruppierung strömen dann in den Aufnahmetank (590), vorzugsweise unter Schwerkraft, wenngleich in manchen Fällen eine geeignete Pumpe verwendet werden kann. Nach beendetem Ernten können die aseptischen Verbindungsstücke (155) und (156) in der sterilen Abdeckung (380) abgetrennt werden, welche dann zur nächsten Gruppierung von Vorrichtungen (10) bewegt werden kann: das entsprechende aseptische Verbindungsstück (155) dieser Gruppierung kann dann mit dem aseptischen Verbindungsstück (156) des U-Rohrs (400) verbunden werden und ermöglicht dadurch das Ernten der Zellen dieser Gruppierung von Vorrichtungen.

[0047] In einer anderen Ausführung kann ein einzelnes Rohr oder ein Satz Rohre (nicht abgebildet) den gemeinsamen Aufnahmetank mit einer Vorrichtung (10) oder einem entsprechenden Satz Vorrichtungen (10) jeweils nacheinander verbinden, wobei eine Förderanlage die Vorrichtung (10) bzw. den Satz Vorrichtungen (10) zu dem einzelnen Rohr oder Satz Rohre oder umgekehrt jeweils transportiert. Nach dem Abernten der Vorrichtung (10) oder des Satzes Vorrichtungen (10) ermöglicht die Förderanlage das Verbinden einer weiteren Vorrichtung (10) oder eines weiteren Satzes von Vorrichtungen (10) mit dem gemeinsamen Aufnahmetank mittels des einzelnen Rohrs bzw. dem Satz Rohre.

[0048] In einer weiteren Ausführung kann jede Vorrichtung (10) einzeln abgeerntet werden, wobei das Erntemittel jeder Vorrichtung das Verunreinigungsverhinderungsmittel für das wesentliche Verhindern eines Einbringens von Verunreinigungen in den Behälter über das Erntemittel nach dem Ernten umfasst. In dieser Ausführung umfasst das Verunreinigungsverhinderungsmittel die vorstehend beschriebene U-förmige Fluidfalle (400) mit einem aseptischen Verbindungsstück (156) an einem Arm derselben, wobei der andere Arm eine Öffnung (158) in Fluidverbindung mit einem Aufnahmetank (590) aufweist. Das Erntemittel umfasst ein aseptisches Verbindungsstück (55), welches mit dem aseptischen Verbindungsstück (156) der Fluidfalle (400) in der beweglichen sterilen Abdeckung (380) unter sterilen Bedingungen verbunden werden kann. Das Ernten wird dann durch Öffnen des Ventils (54) der Vorrichtung durchgeführt, wobei Zellen dann in den Aufnahmetank strömen, vorzugsweise unter Schwerkraft, wenngleich in manchen Fällen eine geeignete Pumpe verwendet werden kann. Nach beendetem Ernten können diese aseptischen Verbindungsstücke (55) und (156) in der sterilen Abdeckung (380) abgetrennt werden, welche dann zur nächsten Vorrichtung (10) bewegt werden kann: das entsprechende aseptische Verbindungsstück (55) des Erntemittels dieser Vorrichtung kann dann mit dem aseptischen Verbindungsstück (156) des U-Rohrs (400) verbunden werden und dadurch das Ernten der Zellen dieser nächsten Vorrichtung ermöglichen.

[0049] In der bevorzugten Ausführung kann das

Erntemittel auch für das erste Bereitstellen von Inokulant am Beginn eines neuen Ablaufs der Wachstums-/Erntezyklen verwendet werden. Das Inokulant kann somit in einem geeigneten Tank mit einem Zufuhrrohr, welches an seinem freien Ende ein aseptisches Verbindungsstück aufweist, das mit dem aseptischen Verbindungsstück (155) des gemeinsamen Ernterohrsystems (154) in der sterilen Abdeckung (308) verbunden wird, mit sterilisiertem Medium gemischt werden. Das Inokulant kann dann unter Schwerkraft oder mit Hilfe einer geeigneten Pumpe zu jeder der Vorrichtungen (10) der Gruppierung über das gemeinsame Ernterohrsystem (154) strömen, woraufhin die aseptischen Verbindungsstücke in der sterilen Abdeckungen abgetrennt werden.

[0050] Alternativ kann das Inokulant über das Zusatzzeinlassmittel, insbesondere das gemeinsame Rohrsystem (180) des Zusatzmittels, in ähnlicher Weise wie vorstehend bezüglich des Erntemittels und des gemeinsamen Ernterohrsystems (155) beschrieben mutatis mutandis in die Vorrichtungen eingebracht werden.

[0051] Die vorliegende Erfindung betrifft auch Verfahren für das Kultivieren und Ernten von Zellen und/oder Gewebe in einer mehrfach verwendbaren Einwegvorrichtung, welches folgende Schritte umfasst:

- a) Vorsehen der vorstehend beschriebenen Vorrichtung (10);
- b) Zuführen steriler Luft zu dem Behälter über das Lufteinlassmittel während jedes Zyklus, entweder ständig oder stoßweise;
- c) Zuführen eines sterilen Kulturmediums und/oder steriler Zusätze über das Zusatzzeinlassmittel;
- d) Bereitstellen eines axenischen Inokulants über das Erntemittel;
- e) Optionales Beleuchten des Behälters mit einem externen Beleuchtungsmittel;
- f) Wachsenlassen der Zellen und/oder des Gewebes in dem Medium auf eine gewünschte Ausbeute
- g) Kontinuierliches Ablassen überschüssiger Luft und/oder Abgase aus dem Behälter über das Gasauslassmittel;
- h) Prüfen auf Verunreinigungen und/oder der Qualität der Zellen/Gewebe, die in dem Behälter erzeugt werden: wenn Verunreinigungen gefunden werden oder die erzeugten Zellen/Gewebe von schlechter Qualität sind, werden die Vorrichtung und ihr Inhalt entsorgt; wenn keine Verunreinigungen gefunden werden, wird Schritt i) durchgeführt;
- i) Ernten mindestens des gewünschten ersten Teils des die Zellen und/oder das Gewebe enthaltenden Mediums, während der restliche zweite Teil des die Zellen und/oder das Gewebe enthaltenden Mediums in dem Behälter belassen wird, wobei der zweite Teil des Mediums als Inokulant für einen nächsten Kultur-/Erntezyklus dienen kann;
- j) Zuführen eines sterilen Kulturmediums und/oder steriler Zusätze für den nächsten Kultur-/Erntezyklus über das Zusatzzeinlassmittel;

k) Mehrfaches Wiederholen der Schritte b), e), f), g), h) und j) bis bei h) Verunreinigungen gefunden werden oder die erzeugten Zellen/Gewebe von schlechter Qualität sind, woraufhin die Vorrichtung und ihr Inhalt entsorgt werden.

[0052] Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Verfahren für das axenische Kultivieren und Ernten von Zellen und/oder Gewebe anaerobisch in einer Gruppe von Einwegvorrichtungen, welches folgende Schritte umfasst:

- a) Vorsehen einer Gruppe (500) von mindestens einer Gruppierung von Vorrichtungen (10), wobei die Vorrichtungen kein Lufteinlassmittel umfassen, und für mindestens eine Vorrichtung (10) derselben:
- b) Zuführen eines axenischen Inokulants zur Vorrichtung über das gemeinsame Ernterohrsystem;
- c) Zuführen eines sterilen Kulturmediums und/oder steriler Zusätze zur Vorrichtung über das gemeinsame Zusatzeinlassrohrsystem;
- d) Optionales Beleuchten des Behälters mit einem externen Beleuchtungsmittel;
- e) Wachsenlassen der Zellen und/oder des Gewebes in der Vorrichtung in dem Medium auf eine gewünschte Ausbeute;
- f) Kontinuierliches Ablassen überschüssiger Luft und/oder Abgase aus der Vorrichtung über das gemeinsame Gasauslassrohrsystem;
- g) Prüfen auf Verunreinigungen und/oder der Qualität der Zellen/Gewebe, die in der Vorrichtung erzeugt werden: wenn Verunreinigungen in der Vorrichtung gefunden werden oder die erzeugten Zellen/Gewebe von schlechter Qualität sind, wird das Erntemittel der Vorrichtung abgesperrt, was eine Verunreinigung der anderen Vorrichtungen der Gruppe verhindert; wenn in allen Vorrichtungen der Gruppe Verunreinigungen gefunden werden oder die darin erzeugten Zellen/Gewebe von schlechter Qualität sind, werden alle Vorrichtungen und deren Inhalt entsorgt; wenn keine Verunreinigungen gefunden werden und die Qualität der erzeugten Zellen/Gewebe annehmbar ist, wird die Vorrichtung als erntefähig betrachtet und Schritt h) wird durchgeführt;
- h) bei jeder erntefähigen Vorrichtung von Schritt g) Ernten des mindestens gewünschten ersten Teils des die Zellen und/oder das Gewebe enthaltenden Mediums über das gemeinsame Ernterohrsystem und das Verunreinigungsverhinderungsmittel zu einem geeigneten Aufnahmetank, während der zweite Teil des die Zellen und/oder das Gewebe enthaltenden Mediums in dem Behälter belassen wird, wobei der zweite Teil des Mediums als Inokulant für einen nächsten Kultur-/Erntezyklus dient;
- i) Zuführen eines sterilen Kulturmediums und/oder steriler Zusätze für den nächsten Kultur-/Erntezyklus über das Zusatzeinlassmittel;
- j) Mehrfaches Wiederholen der Schritte d), e), f), g), h) und i) bis bei g) bei allen Vorrichtungen der Gruppe Verunreinigungen gefunden werden oder die erzeugten Zellen/Gewebe von schlechter Qualität sind, wo-

raufhin die Verunreinigungsverhinderungsmittel von dem gemeinsamen Erntemittel getrennt werden und die Vorrichtungen und ihr Inhalt entsorgt werden.

[0053] Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Verfahren für das axenische Kultivieren und Ernten von Zellen und/oder Gewebe aerobisch in einer Gruppe von Einwegvorrichtungen, welches folgende Schritte umfasst:

- a) Vorsehen einer Gruppe (500) von mindestens einer Gruppierung von Vorrichtungen (10), wobei die Vorrichtungen vorstehend beschriebene Lufteinlassmittel umfassen, und für mindestens eine Vorrichtung (10) derselben:
- b) Zuführen eines axenischen Inokulants zur Vorrichtung über das gemeinsame Ernterohrsystem;
- c) Zuführen eines sterilen Kulturmediums und/oder steriler Zusätze zur Vorrichtung über das gemeinsame Zusatzeinlassrohrsystem;
- d) Zuführen steriler Luft zur Vorrichtung über das gemeinsame Lufteinlassrohrsystem;
- e) Optionales Beleuchten des Behälters mit einem externen Beleuchtungsmittel;
- f) Wachsenlassen der Zellen und/oder des Gewebes in der Vorrichtung in dem Medium auf eine gewünschte Ausbeute;
- g) Kontinuierliches Ablassen überschüssiger Luft und/oder Abgase aus der Vorrichtung über das gemeinsame Gasauslassrohrsystem;
- h) Prüfen auf Verunreinigungen und/oder der Qualität der Zellen/Gewebe, die in der Vorrichtung erzeugt werden: wenn Verunreinigungen in der Vorrichtung gefunden werden oder die erzeugten Zellen/Gewebe von schlechter Qualität sind, wird das Erntemittel der Vorrichtung abgesperrt, was eine Verunreinigung der anderen Vorrichtungen der Gruppe verhindert; wenn in allen Vorrichtungen der Gruppe Verunreinigungen gefunden werden oder die darin erzeugten Zellen/Gewebe von schlechter Qualität sind, werden alle Vorrichtungen und deren Inhalt entsorgt; wenn keine Verunreinigungen gefunden werden und die Qualität der erzeugten Zellen/Gewebe annehmbar ist, wird die Vorrichtung als erntefähig betrachtet und Schritt i) wird durchgeführt;
- i) bei jeder erntefähigen Vorrichtung von Schritt h) Ernten mindestens eines gewünschten ersten Teils des die Zellen und/oder das Gewebe enthaltenden Mediums über das gemeinsame Ernterohrsystem und das Verunreinigungsverhinderungsmittel zu einem geeigneten Aufnahmetank, während der zweite Teil des die Zellen und/oder das Gewebe enthaltenden Mediums in dem Behälter belassen wird, wobei der zweite Teil des Mediums als Inokulant für einen nächsten Kultur-/Erntezyklus dient;
- j) Zuführen eines sterilen Kulturmediums und/oder steriler Zusätze für den nächsten Kultur-/Erntezyklus über das Zusatzeinlassmittel;
- k) Mehrfaches Wiederholen der Schritte d), e), f), g), h), i) und j) bis bei h) bei allen Vorrichtungen der Gruppe die Verunreinigungen gefunden werden oder

die erzeugten Zellen/Gewebe von schlechter Qualität sind, woraufhin die Verunreinigungsverhinderungsmittel von dem gemeinsamen Erntemittel getrennt werden und die Vorrichtungen und ihr Inhalt entsorgt werden.

[0054] Typischerweise liefert ein Wasserreinigungssystem deionisiertes und pyrogenfreies Wasser zu einem Tank, welcher konzentrierte Medien enthält, und verdünnte Medien werden dann über das Zusatzeinlassmittel zu der Vorrichtung (10) gepumpt. In den Zufuhrrohren werden Filter, typischerweise 0,2 µm, und auch direkt stromaufwärts des Zusatzeinlassmittels eingebaut, um das Risiko einer Verunreinigung des Behälterinhalts in jeder Vorrichtung (10) zu minimieren. Alternativ oder zusätzlich kann auch ein Einwegventil zur Minimierung des Risikos verwendet werden.

[0055] Für den ersten Kultivierzyklus jeder Vorrichtung (10) wird typischerweise eine Probe der Art von Zelle, die in der Vorrichtung (10) geerntet werden soll, mit Medien oder Wasser in einem dampfsterilisierten Behälter vorgemischt und über das Erntemittel in die Vorrichtung (10) eingebracht. Die Medien werden dann über das Zusatzeinlassmittel in die Vorrichtung (10) eingeleitet. Bei weiteren Zyklen werden nur die Medien und/oder Zusätze eingebracht, wie vorstehend beschrieben wurde.

[0056] Typischerweise liefert ein Luftkompressor über eine Reihe von Filtern im Wesentlichen sterilisierte Luft zu jeder Vorrichtung (10): über einen groben Filter zum Entfernen von Partikeln, einen Trocken- und einen Feuchtigkeitsfilter für das Entfernen von Feuchtigkeit und einen feinen Filter, typischerweise 0,2 µm, für das Entfernen von Verunreinigungen. Vorzugsweise minimiert ein weiterer Filter direkt stromaufwärts des Lufteinlassmittels das Risiko einer Verunreinigung des Behälterinhalts weiter.

[0057] Bei jeder der Vorrichtungen (10) werden alle Verbindungen zum Behälter (20), d. h. zu dem Lufteinlassmittel, zu dem Zusatzeinlassmittel und vorzugsweise auch zu dem Gasauslassmittel und zu dem Erntemittel vor Gebrauch drucksterilisiert und die Sterilität wird während der Verbindung mit den peripheren Geräten, einschließlich z. B. den Luftzufuhr- und Ablassmitteln, durch das vorstehend beschriebene Vornehmen der Verbindungen in der sterilen Abdeckung gewahrt.

[0058] Die Temperaturregelung für jede Vorrichtung (10) wird vorzugsweise durch geeignete Klimaregelungsmittel vorgenommen. Eine optionale Beleuchtung der Vorrichtung kann durch geeignete Leuchtstoffbeleuchtungsmittel, welche geeignet um die Vorrichtung (10) angeordnet sind, vorgesehen werden, wenn dies für das Zellwachstum erforderlich ist.

[0059] Während jedes Kultivierzyklus jeder Vorrichtung (10) wird der Inhalt jedes entsprechenden Behälters (20) etwa 7 bis 14 Tage lang oder länger unter geregelten Temperatur- und Beleuchtungsbedingungen

gen typisch belüftet und gemischt.

[0060] Am Ende des Kultivierzyklus jeder Vorrichtung (10) wird das entsprechende Erntemittel mittels geeigneter Verbindungsstücke, welche wie vorstehend beschrieben vor und während der Verbindung sterilisiert werden, typischerweise mit einer vorsterilisierten Umgebung verbunden. Dann wird das Ernten durchgeführt, wobei etwa 2,5% bis etwa 45%, wenn gleich typischerweise zwischen etwa 10% bis etwa 20%, der Zellen und/oder Gewebe als Inokulant für den nächsten Zyklus zurückbleiben.

[0061] Die geernteten Zellen/Gewebe können dann je nach Bedarf getrocknet oder extrahiert werden.

[0062] Die vorliegende Erfindung wird nun unter Bezug auf das folgende Beispiel, welches den Schutzbereich der Erfindung nicht einschränken soll, eingehender beschrieben.

Beispiel Kultivieren von Vinca-Zellen

[0063] Es wurde eine Gruppierung von 10 Bioreaktoren (jeder eine erfindungsgemäße Vorrichtung), jeder mit einem Behälter aus Polyethylen-Nylon-Copolymer, (0,1 mm Wandstärke, 20 cm Durchmesser, 1,2 m Höhe), komplett mit 30 mm Öffnungen bei 5 cm (für Lufteinlassmittel), 25 cm (für Erntemittel), 68 cm (Zusatzeinlassmittel) und 90 cm (Gasauslassmittel) von unten her, nutzbares Füllvolumen etwa 10 Liter, verwendet. Die Bioreaktoren wurden zusammen mit ihren anmontierten Teilen durch Gammastrahlung (2,5 mRad) sterilisiert.

[0064] Neun Liter Schenk & Hildebrandt Mineral-/Vitaminmedium, jeweils 2 mg/l Chlorphenoxyessigsäure und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure, 0,2 mg/l Kinetin, 3% Saccharose und 900 ml Füllvolumen Anfangsinokulum der Zellen der Linie V24 Catharanthus roseus (Vinca) wurden in jeden Bioreaktor eingebracht. Das Luftvolumen über der Fläche des Mediums betrug 3 l. Die Belüftung wurde mit Hilfe eines Strömungsvolumens von 1,5 l/min. sterile Luft durchgeführt, zugeführt durch eine 4 mm Öffnung (Lufteinlassmittel), die 1 cm vom Boden des Behälters weg angeordnet war.

[0065] Die Bioreaktoren wurden in einem temperaturgeregelten Raum (25°C) aufgestellt und das Kultivieren wurde 10 Tage lang fortgesetzt, bis das Füllvolumen auf etwa 7,5 l (75% des Gesamtvolumens) zunahm; eine Verdopplungsgeschwindigkeit von 2 Tagen während der logarithmischen Wachstumsphase). Zu diesem Zeitpunkt wurden durch Entnehmen von 9 Liter Medium und Zellen durch das Erntemittel Zellen geerntet und 9 Liter frisches steriles Medium zusammen mit den gleichen Zusätzen wurden über das Zusatzeinlassmittel zugegeben. Die Zellen wurden wieder wie vorstehend 6 weitere Zyklen lang in Intervallen von 10 Tagen geerntet, zu welchem Zeitpunkt der Versuch beendet war.

[0066] Somit wurde ein Gesamtgewicht von 6,5 kg frischer Zellen (0,5 kg Trockengewicht) über sieben Zeiträume zu je 10 Tagen von jedem der Bioreaktoren mit 10 l Kapazität gesammelt. Diese Zellen hatten

einen Gesamtalkaloidgehalt von 0,6%, genauso wie die Startlinie.

[0067] Zwar wurden nur ein paar Ausführungen in der vorstehenden Beschreibung eingehend beschrieben, dennoch ist die vorliegende Erfindung nicht hierauf beschränkt und ist lediglich durch den Schutzbereich der Patentansprüche festgelegt.

Patentansprüche

1. Einwegvorrichtung (10) für das axenische Kultivieren und Ernten von Zellen und/oder Gewebe in mindestens einem Zyklus, wobei die Vorrichtung einen sterilisierbaren transparenten und/oder lichtdurchlässigen nicht starren Einwegbehälter (20) mit einem oberen Ende (26) und einem unteren Ende (28) umfasst, welcher zumindest teilweise mit einem geeigneten sterilen biologischen Zell- und/oder Gewebekulturmedium und/oder axenischen Inokulant und/oder steriler Luft und/oder erforderlichen anderen sterilen Zusätzen gefüllt werden kann, wobei der Behälter Folgendes umfasst:

(i) Gasauslassmittel (90, 96) für das Ablassen überschüssiger Luft und/oder Abgase aus dem Behälter;
(ii) Zusatzeinlassmittel (80, 86) für das Einbringen des Inokulants und/oder des Kulturmediums und/oder der Zusätze in den Behälter;
und **dadurch gekennzeichnet**, dass er weiterhin umfasst:

(iii) wiederverwendbare Erntemittel (50, 52, 56), welche geeignete Stromsteuermittel (54, 55) für das Ermöglichen des Erntens mindestens eines gewünschten Teils des die Zellen und/oder das Gewebe enthaltenden Mediums, wenn dies gewünscht ist, umfassen, wodurch die Vorrichtung ständig für mindestens einen weiteren folgenden Kultivier/Erntezyklus verwendet werden kann, wobei der Behälter so ausgelegt (d2) ist, dass ein Rest des die Zellen und/oder das Gewebe enthaltenden Mediums in dem Behälter verbleiben kann, um als Inokulant für einen nächsten Kultur- und Erntezyklus zu dienen.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, welche weiterhin Lufteinlassmittel für das Einbringen steriler Luft in Form von Bläschen in das Kulturmedium durch eine erste Einlassöffnung umfasst, wobei das Lufteinlassmittel mit einer geeigneten Luftzufuhr verbindbar ist.

3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, bei der das Erntemittel ein Verunreinigungsverhinderungsmittel für das wesentliche Verhindern des Einbringens von Verunreinigungen über das Erntemittel in den Behälter umfasst.

4. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet dass der Behälter aus einem nicht starren Kunststoffmaterial gefertigt ist.

5. Vorrichtung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Material aus der Gruppe, welche Polyethylen, Polycarbonat, ein Copolymer von Polyethylen und Nylon, PVC und EVA umfasst, gewählt wird.

6. Vorrichtung nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Behälter aus einem Laminat von mehr als einer Schicht dieser Materialien gefertigt ist.

7. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 4 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Behälter durch Direktbünden von zwei geeigneten Platten dieses Materials entlang vorbestimmten Falzen gebildet wird.

8. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Lufteinlassmittel ein sich von der Einlassöffnung zu einem Ort in dem Behälter am oder nahe des unteren Endes desselben erstreckendes Lufteinlassrohr umfasst.

9. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens einige der Luftbläschen einen mittleren Durchmesser von etwa 1 mm bis etwa 10 mm aufweisen.

10. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens einige der Luftbläschen einen mittleren Durchmesser von etwa 4 mm aufweisen.

11. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Behälter einen an dem Gasauslassmittel angebrachten geeigneten Filter für das wesentliche Verhindern eines Einbringens von Verunreinigungen über das Gasauslassmittel in den Behälter umfasst.

12. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Behälter weiterhin einen an dem Zusatzeinlassmittel angebrachten geeigneten Filter für das wesentliche Verhindern eines Einbringens von Verunreinigungen über das Zusatzeinlassmittel in den Behälter umfasst.

13. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Verunreinigungsverhinderungsmittel eine U-förmige Fluidfalle umfasst, bei der ein Arm derselben an einem externen Auslass des Erntemittels durch geeignete aseptische Verbindungsmittel aseptisch angebracht ist.

14. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Erntemittel am Boden des unteren Endes des Behälters angeordnet ist.

15. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass das Erntemittel nahe des Bodens des unteren Endes des Behälters angeordnet ist, so dass am Ende jedes Erntezyklus der Rest des die Zellen und/oder das Gewebe enthaltenden Mediums automatisch am unteren Ende des Behälters bis zu einem Füllstand unter der Höhe des Erntemittels verbleibt.

16. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Rest des die Zellen und/oder das Gewebe enthaltenden Mediums etwa 2,5% bis etwa 45% und vorzugsweise etwa 10% bis etwa 20% des ursprünglichen Volumens des Kulturmediums und des Inokulants umfasst.

17. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das untere Ende im Wesentlichen konvex ist.

18. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass das untere Ende im Wesentlichen stumpfkegelig ist.

19. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Behälter ein füllbares Innenvolumen von etwa 5 Liter bis etwa 50 Liter aufweist.

20. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Vorrichtung weiterhin geeignete Befestigungsmittel zum Befestigen derselben an einem geeigneten Halterungsaufbau umfasst.

21. Vorrichtung nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass das Befestigungsmittel eine Materialschleife umfasst, die vorzugsweise an dem oberen Ende des Behälters einstückig angebracht ist.

22. Gruppe besagter Vorrichtungen, welche mindestens zwei Einwegvorrichtungen nach einem der vorstehenden Ansprüche umfasst.

23. Gruppe nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Vorrichtungen durch einen geeigneten Halterungsaufbau über das Befestigungsmittel jeder Vorrichtung gehalten werden.

24. Gruppe nach Anspruch 22 oder 23, dadurch gekennzeichnet, dass das Gasauslassmittel jeder Vorrichtung mit einem gemeinsamen Gasauslassrohrsystem, welches optional geeignete Mittel zum Verhindern eines Strömens von Verunreinigungen in die Vorrichtungen umfasst, geeignet verbunden ist.

25. Gruppe nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass das Mittel zum Verhindern eines Strö-

mens von Verunreinigungen in die Vorrichtungen einen geeigneten Filter umfasst.

26. Gruppe nach einem der Ansprüche 22 bis 25, dadurch gekennzeichnet, dass das Zusatzeinlassmittel jeder Vorrichtung mit einem gemeinsamen Zusatzeinlassrohrsystem mit einem freien Ende, welches daran geeignete aseptische Verbindungsmittel umfasst, geeignet verbunden ist.

27. Gruppe nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass das freie Ende mit einer geeigneten Zufuhr für Medium und/oder Zusätzen verbindbar ist.

28. Gruppe nach einem der Ansprüche 22 bis 27, dadurch gekennzeichnet, dass das Erntemittel jeder Vorrichtung mit einem gemeinsamen Ernterohrsystem mit einem freien Ende, welches daran optional geeignete aseptische Verbindungsmittel umfasst, geeignet verbunden ist.

29. Gruppe nach Anspruch 28, welche weiterhin Verunreinigungsverhinderungsmittel für das wesentliche Verhindern eines Einbringens von Verunreinigungen über das gemeinsame Ernterohrsystem in den Behälter umfasst.

30. Gruppe nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, dass das Verunreinigungsverhinderungsmittel eine U-förmige Fluidfalle umfasst, bei der ein Arm derselben frei ist und eine Öffnung aufweist, und dass das andere Ende derselben an dem freien Ende des gemeinsamen Ernterohrsystems durch geeignete aseptische Verbindungsmittel aseptisch anbringbar ist.

31. Gruppe nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, dass das freie Ende des U-Rohrs mit einem geeigneten Aufnahmetank verbindbar ist.

32. Gruppe nach einem der Ansprüche 22 bis 31, dadurch gekennzeichnet, dass das Lufteinlassmittel jeder Vorrichtung mit einem gemeinsamen Lufteinlassrohrsystem mit einem freien Ende, das daran optional geeignete aseptische Verbindungsmittel umfasst, geeignet verbunden ist.

33. Gruppe nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass das freie Ende mit einer geeigneten Luftzufuhr verbindbar ist.

34. Verfahren für das axenischen Kultivieren und Ernten von Zellen und/oder Gewebe in einer Einwegvorrichtung, welches folgende Schritte umfasst:

a) Vorsehen der Vorrichtung, welche einen sterilisierbaren transparenten und/oder lichtdurchlässigen nicht starren Einwegbehälter mit einem oberen Ende und einem unteren Ende umfasst, welcher zumindest teilweise mit einem geeigneten sterilen biologischen Zell- und/oder Gewebekulturmedium und/oder axeni-

schen Inokulant und/oder steriler Luft und/oder erforderlichen anderen sterilen Zusätzen gefüllt werden kann, wobei der Behälter Folgendes umfasst:

(i) Gasauslassmittel für das Ablassen überschüssiger Luft und/oder Abgase aus dem Behälter;

(ii) Zusatzeinlassmittel für das Einbringen des Inokulants und/oder des Kulturmediums und/oder der Zusätze in den Behälter;

und dadurch gekennzeichnet, dass er weiterhin umfasst:

(iii) wiederverwendbare Erntemittel, welche geeignete Stromsteuermittel für das Ermöglichen des Erntens mindestens eines gewünschten Teils des die Zellen und/oder das Gewebe enthaltenden Mediums, wenn dies gewünscht ist, umfassen, wodurch die Vorrichtung ständig für mindestens einen weiteren folgenden Kultivier-/Erntezyklus verwendet werden kann, wobei der Behälter so ausgelegt ist, dass ein Rest des die Zellen und/oder das Gewebe enthaltenden Mediums in dem Behälter verbleiben kann, um als Inokulant für einen nächsten Kultur- und Erntezyklus zu dienen;

b) Zuführen eines axenischen Inokulants über das Erntemittel;

c) Zuführen eines sterilen Kulturmediums und/oder steriler Zusätze über das Zusatzeinlassmittel;

d) Optionales Beleuchten des Behälters mit einem externen Beleuchtungsmittel;

e) Wachsenlassen der Zellen und/oder des Gewebes in dem Medium auf eine gewünschte Ausbeute;

f) Kontinuierliches Ablassen überschüssiger Luft und/oder Abgase aus dem Behälter über das Gasauslassmittel;

g) Prüfen auf Verunreinigungen und/oder der Qualität der Zellen/Gewebe, die in dem Behälter erzeugt werden: wenn Verunreinigungen gefunden werden oder die erzeugten Zellen/Gewebe von schlechter Qualität sind, werden die Vorrichtung und ihr Inhalt entsorgt; wenn keine Verunreinigungen gefunden werden, wird Schritt h) durchgeführt;

h) Ernten des gewünschten Teils des die Zellen und/oder das Gewebe enthaltenden Mediums, während der Rest des die Zellen und/oder das Gewebe enthaltenden Mediums in dem Behälter belassen wird, wobei der Rest des Mediums als Inokulant für einen nächsten Kultur-/Erntezyklus dient;

i) Zuführen eines sterilen Kulturmediums und/oder steriler Zusätze für den nächsten Kultur-/Erntezyklus über das Zusatzeinlassmittel;

j) Mehrfaches Wiederholen der Schritte d), e), f), g),

h) und i) bis bei g) Verunreinigungen gefunden werden oder die erzeugten Zellen/Gewebe von schlechter Qualität sind, woraufhin die Vorrichtung und ihr Inhalt entsorgt werden.

35. Verfahren nach Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, dass die Vorrichtung weiterhin Lufteinlassmittel für das Einleiten steriler Luft in Form von Bläschen in das Kulturmedium durch eine erste Einlassöffnung, die mit einer geeigneten sterilen Luftzu-

fuhr verbindbar ist, umfasst, wobei das Verfahren weiterhin den Schritt des Zuführens steriler Luft zu dem Lufteinlassmittel während des ersten und jedes folgenden Zyklus umfasst.

36. Verfahren nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, dass die sterile Luft während mindestens eines Kultivierzyklus ständig zugeführt wird.

37. Verfahren nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, dass die sterile Luft während mindestens eines Kultivierzyklus stoßweise zugeführt wird.

38. Verfahren für das axenische Kultivieren und Ernten von Zellen und/oder Gewebe in einer Gruppe von Einwegvorrichtungen, welches folgende Schritte umfasst:

a) Vorsehen einer Gruppe von Vorrichtungen nach Anspruch 30 und für mindestens eine Vorrichtung derselben;

b) Zuführen eines axenischen Inokulants zur Vorrichtung über das gemeinsame Ernterohrsystem;

c) Zuführen eines sterilen Kulturmediums und/oder steriler Zusätze zur Vorrichtung über das gemeinsame Zusatzeinlassrohrsystem;

d) Optionales Beleuchten des Behälters mit einem externen Beleuchtungsmittel;

e) Wachsenlassen der Zellen und/oder des Gewebes in der Vorrichtung in dem Medium auf eine gewünschte Ausbeute;

f) Kontinuierliches Ablassen überschüssiger Luft und/oder Abgase aus der Vorrichtung über das gemeinsame Gasauslassrohrsystem;

g) Prüfen auf Verunreinigungen und/oder der Qualität der Zellen/Gewebe, die in der Vorrichtung erzeugt werden: wenn Verunreinigungen in der Vorrichtung gefunden werden oder die erzeugten Zellen/Gewebe von schlechter Qualität sind, wird das Erntemittel der Vorrichtung abgesperrt, was eine Verunreinigung der anderen Vorrichtungen der Gruppe verhindert; wenn in allen Vorrichtungen der Gruppe Verunreinigungen gefunden werden oder die darin erzeugten Zellen/Gewebe von schlechter Qualität sind, werden alle Vorrichtungen und deren Inhalt entsorgt; wenn keine Verunreinigungen gefunden werden und die Qualität der erzeugten Zellen/Gewebe annehmbar ist, wird die Vorrichtung als erntefähig betrachtet und Schritt h) wird durchgeführt; h) bei jeder erntefähigen Vorrichtung von Schritt g) Ernten des gewünschten Teils des die Zellen und/oder das Gewebe enthaltenden Mediums über das gemeinsame Ernterohrsystem und das Verunreinigungsverhinderungsmittel zu einem geeigneten Aufnahmetank, während der Rest des die Zellen und/oder das Gewebe enthaltenden Mediums in dem Behälter belassen wird, wobei der zweite Teil des Mediums als Inokulant für einen nächsten Kultur-/Erntezyklus dient;

i) Zuführen eines sterilen Kulturmediums und/oder steriler Zusätze für den nächsten Kultur-/Erntezyklus über das Zusatzeinlassmittel;

j) Mehrfaches Wiederholen der Schritte d), e), f), g), h) und i) bis bei g) bei allen Vorrichtungen der Gruppe Verunreinigungen gefunden werden oder die erzeugten Zellen/Gewebe von schlechter Qualität sind, woraufhin die Verunreinigungsverhinderungsmittel von dem gemeinsamen Erntemittel getrennt werden und die Vorrichtungen und ihr Inhalt entsorgt werden.

Gruppe die Verunreinigungen gefunden werden oder die erzeugten Zellen/Gewebe von schlechter Qualität sind, woraufhin die Verunreinigungsverhinderungsmittel von dem gemeinsamen Erntemittel getrennt werden und die Vorrichtungen und ihr Inhalt entsorgt werden.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

39. Verfahren für das axenische Kultivieren und Ernten von Zellen und/oder Gewebe in einer Gruppe von Einwegvorrichtungen, welches folgende Schritte umfasst:

- a) Vorsehen einer Gruppe von Vorrichtungen nach Anspruch 33 und für mindestens eine Vorrichtung derselben;
- b) Zuführen eines axenischen Inokulants zur Vorrichtung über das gemeinsame Ernterohrsystem;
- c) Zuführen eines sterilen Kulturmediums und/oder steriler Zusätze zur Vorrichtung über das gemeinsame Zusatzeinlassrohrsystem;
- d) Zuführen steriler Luft zur Vorrichtung über das gemeinsame Lufteinlassrohrsystem;
- e) Optionales Beleuchten des Behälters mit einem externen Beleuchtungsmittel;
- f) Wachsenlassen der Zellen und/oder des Gewebes in der Vorrichtung in dem Medium auf eine gewünschte Ausbeute;
- g) Kontinuierliches Ablassen überschüssiger Luft und/oder Abgase aus der Vorrichtung über das gemeinsame Gasauslassrohrsystem;
- h) Prüfen auf Verunreinigungen und/oder der Qualität der Zellen/Gewebe, die in der Vorrichtung erzeugt werden: wenn Verunreinigungen in der Vorrichtung gefunden werden oder die erzeugten Zellen/Gewebe von schlechter Qualität sind, wird das Erntemittel der Vorrichtung abgesperrt, was eine Verunreinigung der anderen Vorrichtungen der Gruppe verhindert; wenn in allen Vorrichtungen der Gruppe Verunreinigungen gefunden werden oder die darin erzeugten Zellen/Gewebe von schlechter Qualität sind, werden alle Vorrichtungen und deren Inhalt entsorgt; wenn keine Verunreinigungen gefunden werden und die Qualität der erzeugten Zellen/Gewebe annehmbar ist, wird die Vorrichtung als erntefähig betrachtet und Schritt i) wird durchgeführt;
- i) bei jeder erntefähigen Vorrichtung von Schritt h) Ernten mindestens eines gewünschten Teils des die Zellen und/oder das Gewebe enthaltenden Mediums über das gemeinsame Ernterohrsystem und das Verunreinigungsverhinderungsmittel zu einem geeigneten Aufnahmetank, während der Rest des die Zellen und/oder das Gewebe enthaltenden Mediums in dem Behälter belassen wird, wobei der Rest des Mediums als Inokulant für einen nächsten Kultur-/Erntezyklus dient;
- j) Zuführen eines sterilen Kulturmediums und/oder steriler Zusätze für den nächsten Kultur-/Erntezyklus über das Zusatzeinlassmittel;
- k) Mehrfaches Wiederholen der Schritte d), e), f), g), h), i) und j) bis bei h) bei allen Vorrichtungen der

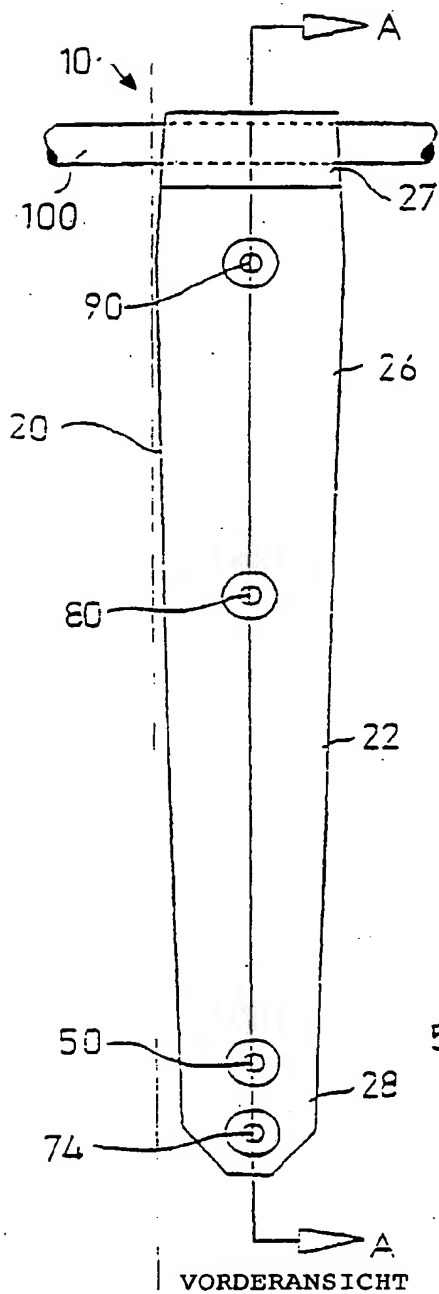


Fig. 1a

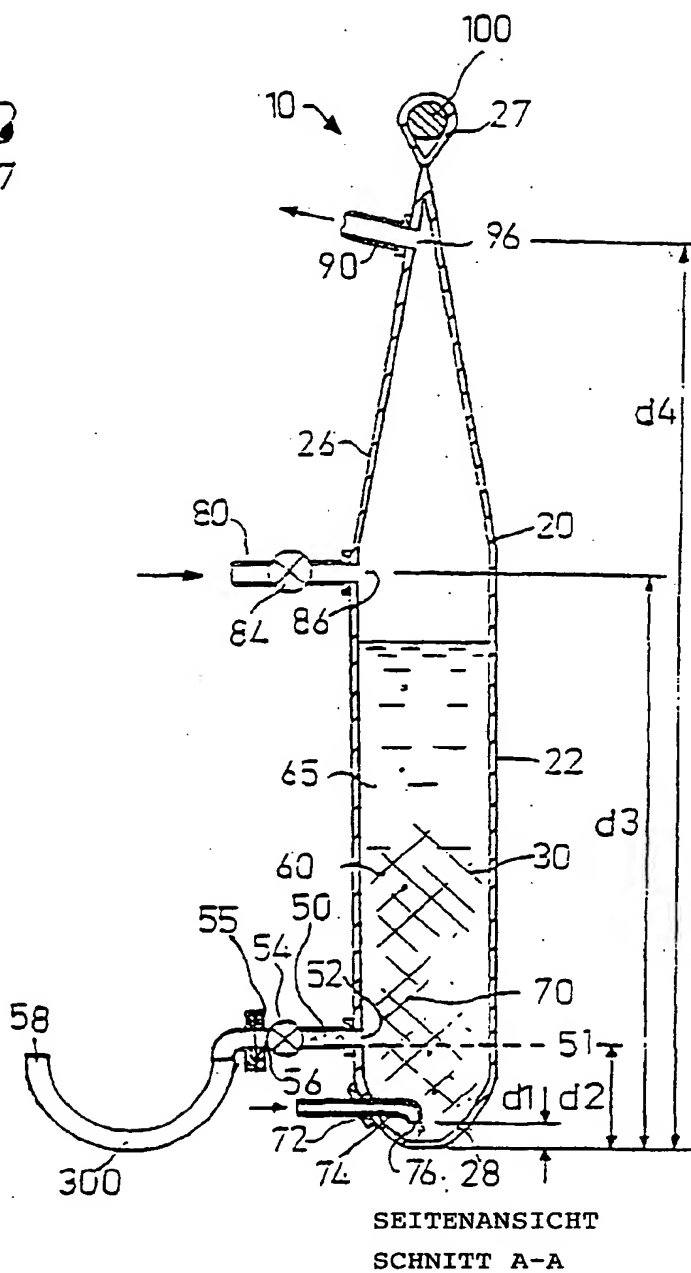


Fig. 1b

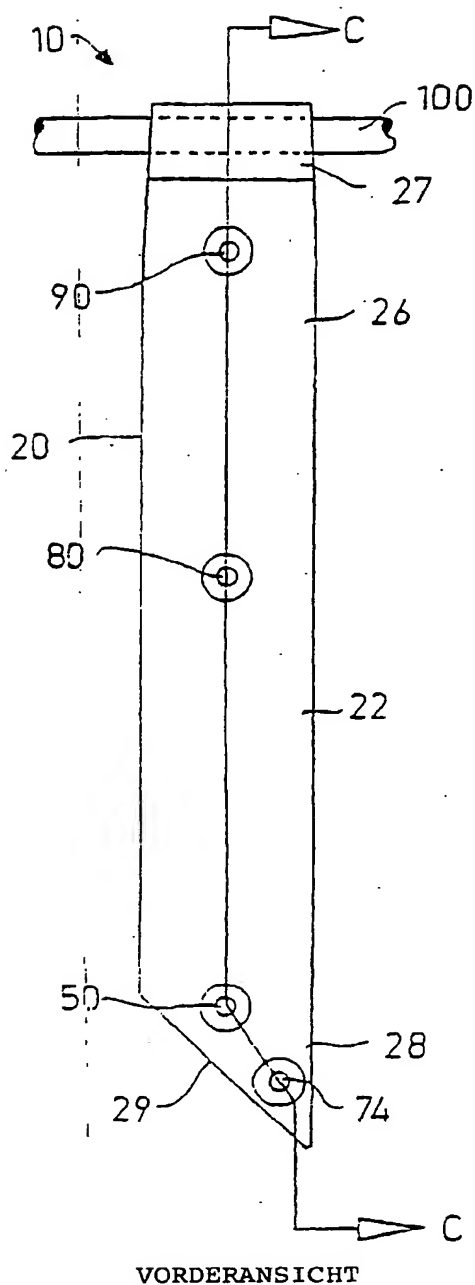


Fig. 2a

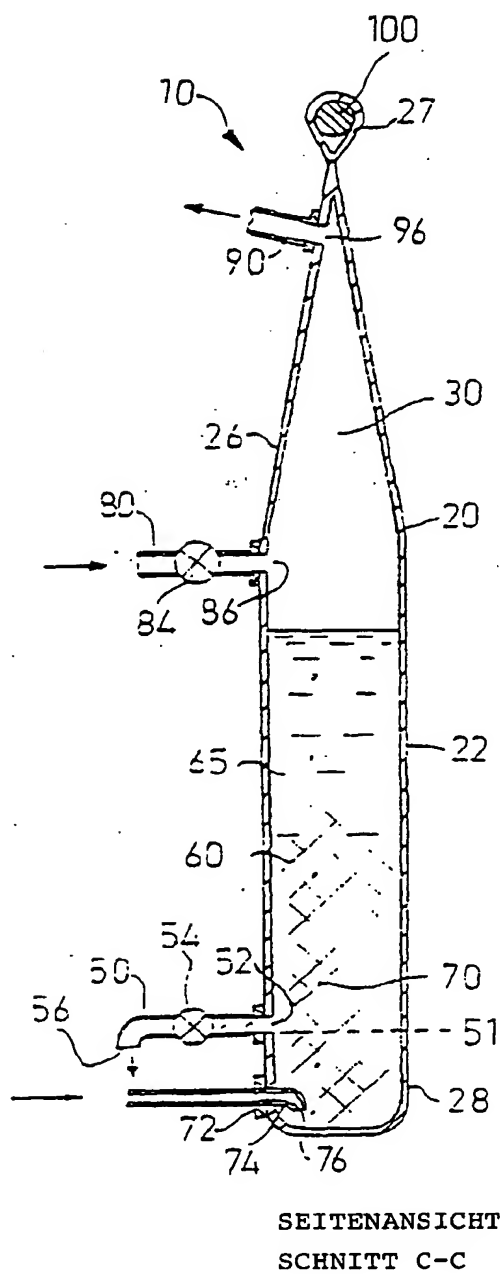


Fig. 2b

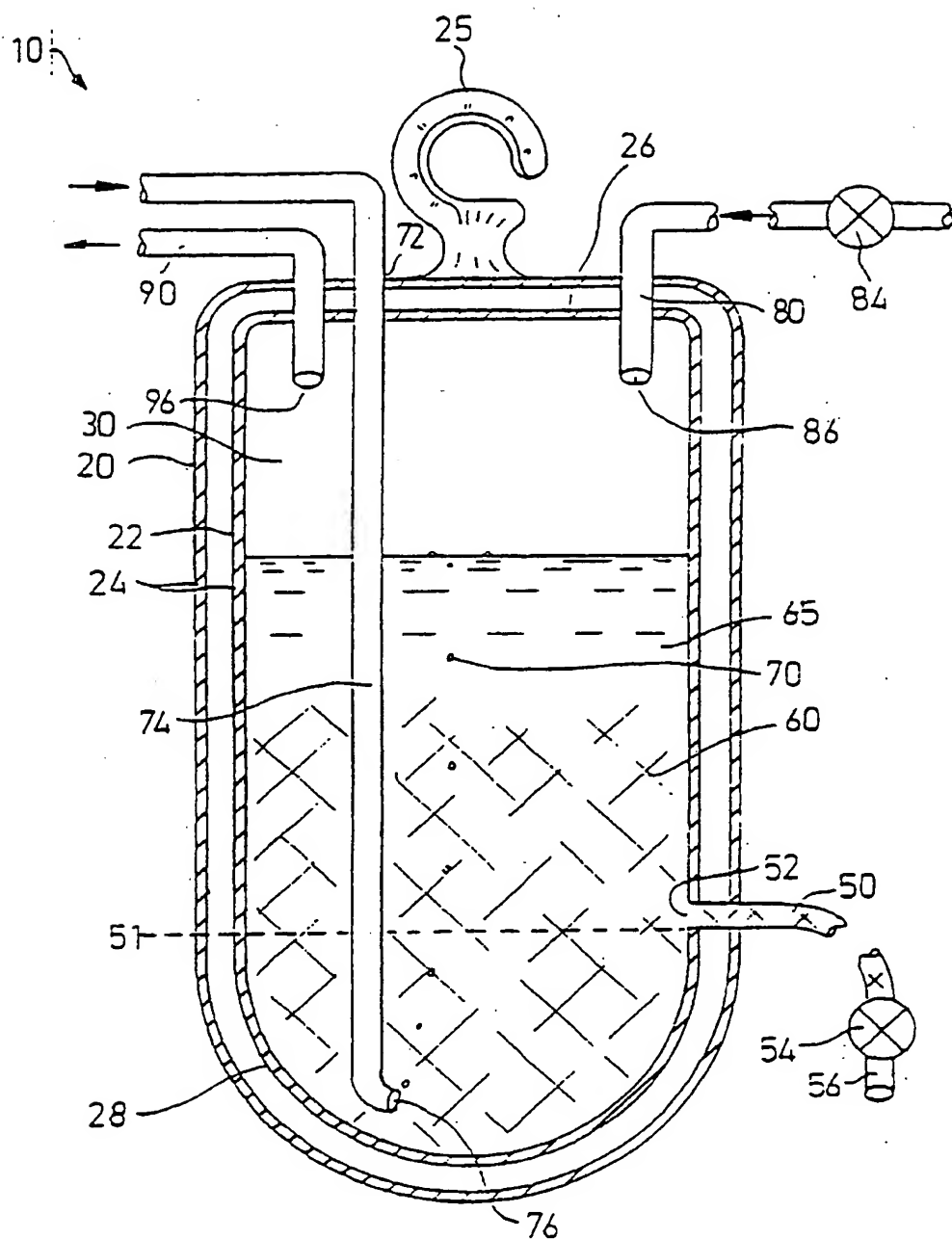
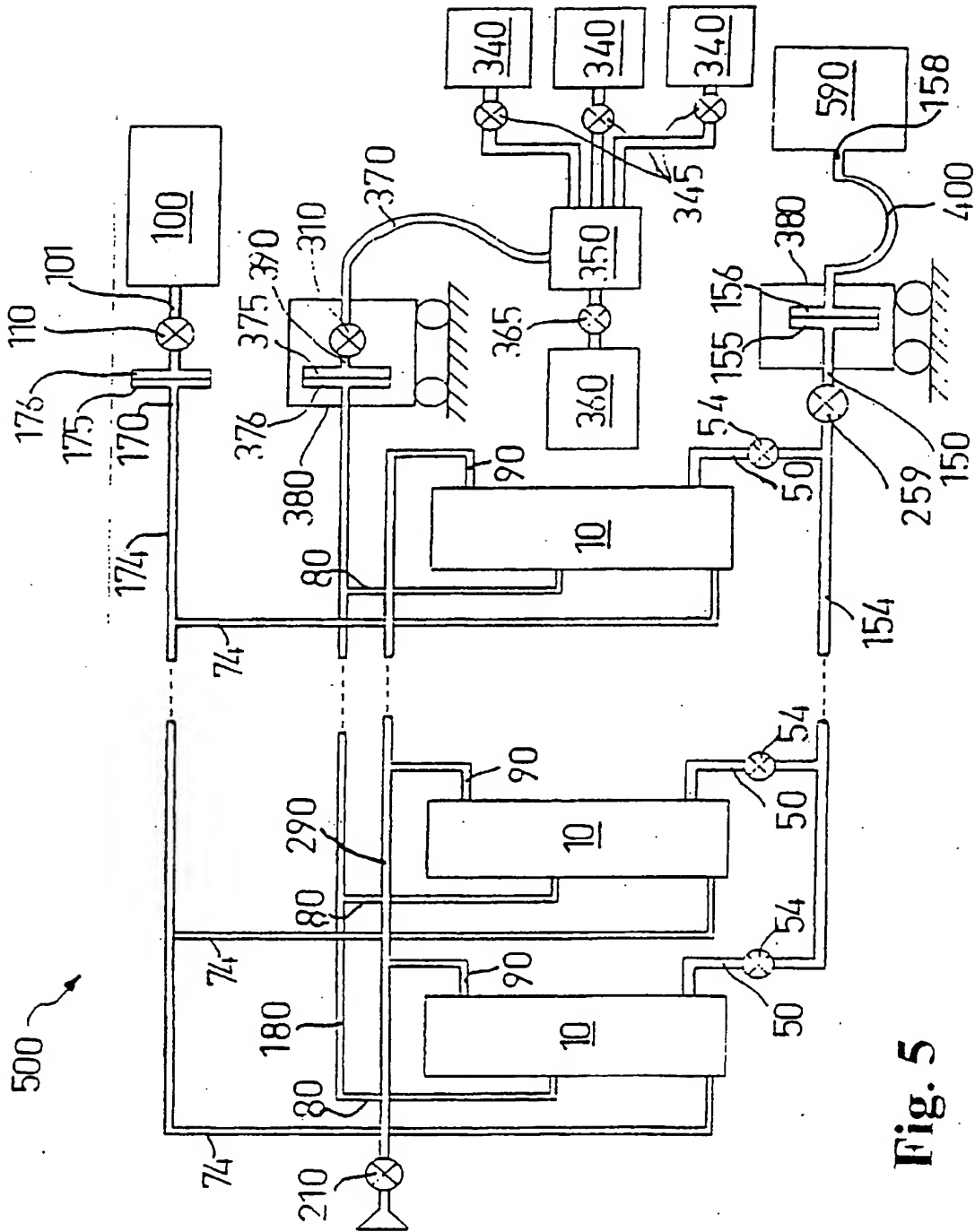


Fig. 3



Fi. 5